DOI:10.11931/guihaia.gxzw201810025

刺梨 *GL2* 同源基因的克隆、系谱树和表达分析

黄小龙 [1,2]，陈婷婷 [1,2]，张琴琴 [1,2]，莫佳佳 [1,2]，龚盼琴 [1,2]，闫慧清 [1]*

（1. 贵州师范大学生命科学学院，贵州省植物生理与发育调控重点实验室，贵阳 550001；

2. 国家林业局西南喀斯特山地生物多样性保护重点实验室，贵阳 550001）

摘要：刺梨的果刺给水果采摘和食品加工带来不便。本文从刺梨果实中克隆得到与果刺发育形成相关的基因 *RrGL2*，为研究果刺的形成和发育的分子机制提供了理论基础。通过石蜡切片观察刺梨果实的果刺细胞学发育过程。以刺梨‘贵农 5 号’的 cDNA 为模板，通过 RACE 克隆获得刺梨中与拟南芥表皮毛形成 *GL2* 的同源基因 *RrGL2*，并对该基因进行生物信息学分析和表达分析。刺结构在花芽形成早期基部内的细胞首先不断分裂，向外继续发育，中部的细胞变细、变长形成“针”状结构，顶部的细胞逐渐木质化使刺变硬，形成果刺。通过 RACE 扩增得到 *RrGL2* 的 cDNA 全长 2 292bp，编码 763aa 氨基酸。RrGL2 具有 Homeodomain 同源结构域和 StAR 磷脂酰胆碱转移蛋白的结构域，RrGL2 与其他物种编码的 GL2 氨基酸同源性高度相似，并且系谱树分析揭示刺梨 RrGL2 和草莓属亚种的 GL2 密切相关。最后，qRT-PCR 分析表明，*RrGL2* 在茎和果实中的表达水平高于其他组织，在花后 7 周果刺中的表达最高，是 3 周和 5 周果刺中的 7.87 倍和 2.10 倍。*RrGL2* 的功能与果刺的形成发育密切相关，该研究为刺梨中刺形成的分子机制和育种提供了理论基础。

关键词：刺梨，表皮毛，果刺，*RrGL2*，基因表达

中图分类号：S661.9　　　　**文献标志码：A**

Cloning, phylogenic and expression analysis of *GL2* homology gene in *Rosa roxburghii*

HUANG Xiaolong[1,2], CHEN Tingting[1,2], ZHANG Qinqin[1,2], MO Jiajia[1,2], GONG Panqin[1,2], YAN Huiqing[1]*

(1.*Guizhou Normal University*, *School of Life Science*, *Key Laboratory of Plant Physiology and Development Regulation*, Guiyang 550001, China; 2. *National Forestry Administration*, *Karst Key Laboratory of Biodiversity Conservation in Southwest China*, Guiyang 550001, China)

Abstract: The prickles of *Rosa roxburghii* might induce inconveniences in fruit harvesting and food processing. *Rosa roxburghii GLABROUS 2* (*RrGL2*), a prickle-development related *AtGL2* homology gene, was isolated from ‘Guinong 5’ and made relative biological analysis in this paper. These results could provide theoretical basis for thorn formation and development. The cytological development of fruit thorn of *Rosa roxburghii* was observed by paraffin section. Leaves of *Rosa roxburghii* was used to synthesize cDNA based on the manufacturer’s instructions of RACE. Subsequently *RrGL2* was made relative informatics analysis and the gene expression level was evaluated. The base cells continuously divided at the early stage of flower bud, then outward developed. The middle cells continued to become thinner and longer to form a “needle” structure. In the early stage of flower bud formation, the cells in the base of the thorn structure first divided continuously and continued to develop outwards. The cells in

基金项目：国家自然科学基金（31660554）；贵州省科学技术基金（黔科合 J 字[2015]2117 号）[Supported by the National Natural Science Foundation of China (31660554); Guizhou Science and Technology Fund (Qiankehe [2015]2117)]。

作者简介：黄小龙(1986-)，男，浙江乐清市，博士，副教授，研究方向为刺梨果刺的发育，(E-mail)hxl2014gznu@126.com。

***通信作者：**闫慧清，博士，副教授，研究方向为果树学，(E-mail)yanhuiqing@gznu.edu.cn。

the middle became thinner and longer, forming a "needle" structure. The lignification gradually was observed at the top cells to make the prickles hard. The full lengths of *RrGL2* was 2, 292 bp by RACE, encoding 763 amino acids. The RrGL2 has a structure of homeodomain and StAR phosphatidylcholine transfer protein, which is likely to regulate the development of *Rosa roxburghii* prickles. Then, a search for homologous species in the NCBI databases revealed a high similarity of amino acid homology encoded by the *RrGL2* with other *Rosa* species, and phylogenic analysis revealed a close relationship of structure domains between *Rosa roxburghii* and *Fragaria vesca* subsp. Finally, real-time PCR analysis showed that the relative expression value of *RrGL2* in fruit prickles at 7 weeks after flowering was the highest, almost respectively 7.87 times and 2.10 times than that at 3 weeks and at 5 weeks after flowering. *RrGL2*, a prickles-forming gene acted to regulate the morphology and development of prickles. This work may provide a way for further researches on the molecular mechanisms underlying the formation and development of prickles in *Rosa roxburghii*, and a molecular basis for the cultivation of a thornless fruits of *Rosa roxburghii* through genetic engineering.

Key words: *Rosa roxburghii*, trichomes, prickles, *RrGL2*, gene expression

刺梨（*Rosa roxburghii*）作为蔷薇科的一种果实，因具有良好的风味和较高的营养价值深受消费者喜爱，在中国西南地区尤其是贵州省大规模种植。果实中含有一些酚类化合物、抗氧化物等(Van et al., 2008)，因此可作为放射性保护剂和肿瘤抑制剂(Xu et al., 2014; Liu et al., 2012)。同时刺梨也是果汁和干果的重要原料。然而，刺梨果实密披果刺，果刺对水果采摘、食品加工、田间和果园管理造成不便。近年来随着园艺业的发展，植物果刺已经引起越来越多的关注。

刺是广泛存在于许多植物中由表皮组织生长所形成的渐尖突起(Kellogg et al., 2011)，可存在于叶、茎、果实和其他器官(Feng et al., 2015)。刺的存在增加植物表皮厚度，减少热量和水分的散失，防止昆虫和病原体的侵袭或机械损伤(Gomes et al., 2012)。目前研究表明，覆盆子和玫瑰的刺来源于修饰的腺毛，它们继续生长并最终硬化成最终的刺状形态，作为表皮组织的外生物。因此，刺是表皮毛与少数皮层细胞的变形所形成的。表皮毛是植物器官表面一种特殊的单细胞结构。表皮毛发育所需基因的时空表达受一种三元激活复合物协调(An et al., 2011)。植物表皮毛发育的调节特别是在拟南芥中的研究取得了很大的进展。通过转录因子 MYB[GLABRA 1（GL1），WEREWOLF，CAPRICE，TRIPTYCHON]、WD-40 型[(TRANSPARENT TESTA GLABRA 1（TTG1]、bHLH[GLABRA 3（GL3）]和 ENHANCER of GLABRA 3（EGL3），HD-zip[GLABRA2（GL2）]和 WRKYl 类转录因子[TRANSPARENT TESTA GLABRA2（TTG2）](Zhao et al., 2008; Gan et al., 2011)。酵母双杂交实验得到 GL1 和 TTG1 可以结合到 GL3 和 EGL3 的不同区域，表明 MYB-bHLH-WD40 复合物可形成三聚体转录激活成分，并调控表皮毛发育的下游基因和形态发生(Pesch et al., 2015; Ramsay & Glover, 2015)。GL2 可通过反馈机制激活参与表皮毛成熟的 TTG1 复合体来切换 MYB-bHLH-WD40 复合体的功能。在表皮毛和根毛的形成过程中，两个相邻的细胞能够相互竞争 GL2/TTG1 等表达调控因子(Pu et al., 2003)。

GL2 在表皮毛形态发生中发挥着重要作用，包括细胞分枝、扩张和细胞壁成熟(Szymanski et al., 1998)。*GL2* 是一种同源框基因，编码含有 StAR（steroidogenic acute regulatory protein）结构域的 HD-Zip 转录因子。这种同源框蛋白可在植物不同的发育过程中协调靶基因的表达(Rerie et al., 1994; Di & Al, 1996)。*GL2* 在成熟

表皮毛中持续表达，并且是在早期形态发生中非根毛细胞和表皮毛分化所必需(Fyvie et al., 2015)。近期研究表明，*GL2* 是调节根毛发育所必需的，并且优先在根的分生组织和伸长区域内的非毛发表皮细胞中表达(Masucci et al., 1996)。*gl2* 突变体和 *gl2*/*gl3* 双突变体均影响表皮毛的形态发生，使叶片上的表皮毛降解和减少，同时 *gl-2* 突变体还具有种皮粘液缺乏、形成异位根毛等表型(Gao et al., 2008; Shi et al., 2012)。此外 *gl2* 突变体不能形成围绕表皮毛的毛状辅助细胞。遗传实验表明，*GL2* 是 GL1 和 TTG1 的下游调控基因 (Pesch & Hülskamp, 2011)。

本研究利用贵州省广泛种植的‘贵农 5 号’分离克隆与果刺发育有关的 *RrGL2*，对 *RrGL2* 基因进行了生物信息分析和时空表达检测，可为进一步研究刺梨果刺形成和发育的分子机制以及通过基因工程培育刺梨无刺果实提供了遗传资源和理论基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料和细胞学分析

采集刺梨‘贵农 5 号’的叶片和果实后，一部分立即在液氮中冷冻并储存在-80 ℃。选择叶，幼果和成熟果实并收集花后 3 周、5 周和 7 周的果刺以检测 *RrGL2* 的表达水平。另一部分通过体视显微镜（SZX7，OLYMPUS，Japan）观察并拍照。

采摘不同时期的幼芽用 FAA 固定液固定，先在离心管中装入 3 mL 固定液，将样品放入固定液中，封口膜封口，用解剖针在封口膜上扎几个小孔，然后抽真空，抽过真空后再加入 2 mL 固定液（样品与固定液之比约为 1:20）。若长期保存应将固定液换成 70%酒精，4 ℃冰箱保存。第 1 天用 70%酒精过夜，第 2 天用 85%酒精、95%酒精、无水酒精、无水酒精、1/5 二甲苯、(吸出瓶内 1/5 试剂，再加 1/5 二甲苯)、2/5 二甲苯；(吸出瓶内 1/5 试剂，再加 1/5 二甲苯)、3/5 二甲苯；(吸出瓶内 1/5 试剂，再加 1/5 二甲苯)、4/5 二甲苯；(吸出瓶内 1/5 试剂，再加 1/5 二甲苯)、纯二甲苯；(吸出瓶内全部液体，加入新液)、纯二甲苯处理后加碎蜡（放入 36 ℃烘箱，放置 3 d 以上）洗涤。将已固着和修好的蜡块装在样品固定器上，并固定好。将切片刀装在切片机上。调节刀片的厚度为 8~15 μm。

将切出的蜡带，平展于盒内以供展片。之后经显微镜（BX53，Olympus，Japan）观察，SPOT FLEX™CCD 拍摄（Diagnostic Instrument，USA）。

1.2 RNA 提取和纯化

使用 Trizol 试剂（TaKaRa，Japan）提取茎、叶片、花芽、种子和以及花后 3 周、5 周和 7 周的皮刺部位的总 RNA，具体步骤参考试剂盒说明。先用 DNA 酶（TaKaRa，Japan）处理 RNA 样品。然后根据试剂盒说明使用 oligo dT-接头引物的 RT-PCR Kit（TaKaRa，Japan）将提取的 RNA 进行逆转录。

1.3 分离 GL2 cDNA

3'RACE

利用 3' RACE（TaKaRa，Japan）试剂盒以刺梨叶片提取的 RNA 进行第一链 cDNA 合成。根据 NCBI（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）下载的其他生物所报道的与果刺发育有关的 *GL2* 同源序列设计引物。用引物进行两轮 PCR 扩增基因的 3' 末端（表 1）。第一轮 PCR：首先 94 ℃变性 3 min，然后进行 20 个循环的扩增（94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 2 min）和最后 72 ℃延伸 10 min。然后以第一轮 PCR 产物作为第二次 PCR

扩增的模板，并且在与第一轮 PCR 相同的条件下运行 35 个循环。

表 1 *GL2* cDNA 克隆 RACE 引物

Table.1 Primers used for *RrGL2* isolation from *Rosa roxburghii*

引物 Primer	引物序列（5′-3′） Sequences of primers	应用 Application	退火条件 Annealing conditions	
			温度 Tm(℃)	时间 Time(min)
RrGL2-1	TAGCTGCATAAATGCTTACG	1st of 3′ RACE	55	2
RrGL2-2	AATCGCAGGAACGAGTGGG	2nd of 3′ RACE	55	2
RrGL2-3	GGGGTGACTCCTTGAACA	5′ RACE	55	2

5'RACE

根据 SMARTerTM RACE cDNA 扩增试剂盒（No.634923，Clontech），以叶片总 RNA 为模板合成 cDNA 第一链。按照上述 3'末端的序列合成基因特异性引物（表 1）进行 Touch-down PCR：5 个循环（94 ℃，30 s；72 ℃，90 s。），然后 5 个循环（94 ℃，30 s；70 ℃，30 s；72 ℃，1 min。），最终 30 个循环（94 ℃，30 s；55 ℃，2 min；72 ℃，2 min）。

1.4 克隆和测序

PCR 产物用 1％琼脂糖凝胶检测，挖胶回收后以琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒（DV805A，TaKaRa，Janpan）纯化，克隆到 pMD18-T 载体（TaKaRa，Janpan）中，最后热激法转化大肠杆菌 *DH5α* 菌株（Trans，China）。阳性克隆由上海生工生物工程技术服务有限公司（中国上海）测序。

1.5 序列分析

使用 NCBI ORF finder 对 PCR 扩增获得的 *GL2* 开放阅读框片段进行分析。通过 NCBI BLASTp 获得 RrGL2 同源蛋白。使用 ProtParam 分析蛋白质的分子量、等电点和氨基酸组成。用 ProtScale 的 Kyte & Doolittle 方法预测这些蛋白质的亲水性或疏水性。TMHMM 2.0 服务器（http://www.cbs.dtu.dk/services/ TMHMM/）用于预测蛋白质的跨膜结构域。SMART 在线预测蛋白质结构域。ESPript 3.0（http://espript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/）预测蛋白质二级结构。Mega6.0 软件 Neighbor-Joining 法用于构建系谱树。

1.6 基因表达检测

使用 FastStart DNA Master SYBR Green I 试剂盒在 LightCycler 480 仪器（Roche，Switzerland）中进行 *RrGL2* 的 qRT-PCR 检测。*β-actin* 作为内参基因。引物为 *RrGL2*: Forward (5′-3′): CGAGGCAGTGACAGTGAAGG; Reverse (5′-3′): GGCAGACTCAACAGACTCCATAG. *β-actin*: Forward (5′-3′): CCGCCATGTA TGTTGCCATCC; Reverse (5′-3′): AGCCAGGTCAAGACGCAGAAT。

qRT-PCR 程序根据 SYBR 说明书进行，扩增进行 40 个循环：在 95 ℃变性 30 s，在 55 ℃退火 30 s，并在 72 ℃延伸 1 min。相对于对照的表达水平通过计算△△Ct（△△Ct=sample △Ct – control △Ct, △Ct= *RrGL2* Ct -*β-actin* Ct，然后用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 方法分析。

1.7 统计分析

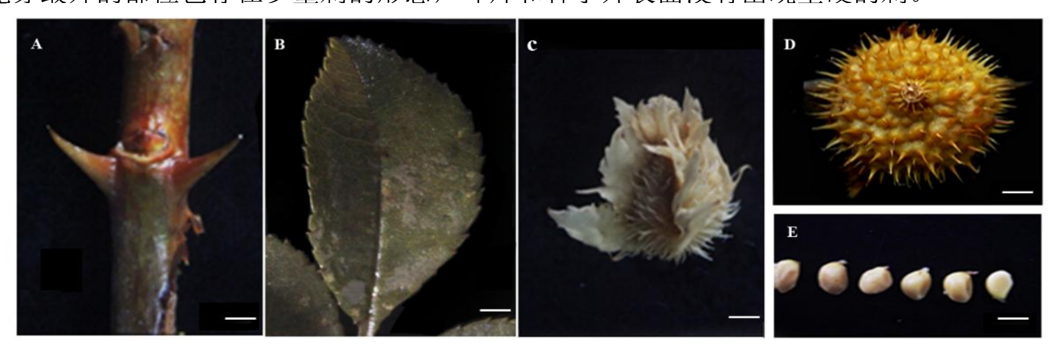
本研究中的所有数据均为三次生物学重复的平均值和相应的标准偏差表示。使用 SPSS 单因素方差分析

方法分析获得的数据，Duncan 多重检验以比较统计显著性差异（P <0.05）。

2 结果与分析

2.1 刺梨不同组织的观察和早期细胞学研究

分别选取刺梨的不同部位观察，如图 1 所示，包括的组织有茎（图 1：A）、叶（图 1：B）、花芽（图 1：C）、果实（图 1：D）和种子（图 1：E）。在茎和果实的组织表面上观察到有一些坚硬的刺，分别为枝刺和果刺。在花芽最外的部位也存在少量刺的形态，叶片和种子外表面没有出现坚硬的刺。



注：A. 茎，Bar =1 cm；**B**. 叶，Bar=0.5 cm；**C**. 花芽，Bar=0.5 cm；**D**. 果实，Bar=1 cm；**E**. 种子，Bar=1 mm。
Note: A. Stem, Bar =1 cm; **B**. Leaves, Bar=0.5 cm; **C**. Flower bud, Bar=0.5 cm; **D**. Fruit, Bar=1 cm; **E**. Seed, Bar=1 mm.

图 1 刺梨不同组织的观察
Fig.1 Various tissues of *Rose roxburghii*

进一步选取不同发育阶段的果实进行果刺数量和长度的统计，如表 2 所示。选取花后 3、5 和 7 周形成的果实，此时刺梨果实的直径分别是 1.5、2.3 和 3.4 cm。将果实分为三个部位进行统计，分别为上部、中部和下部。从表 2 中可以得到，在不同的发育时期，果刺的数量均主要集中在中部，上部和下部数量较少。而随着果实的发育，三个部位果刺的长度均发生显著性的增加。

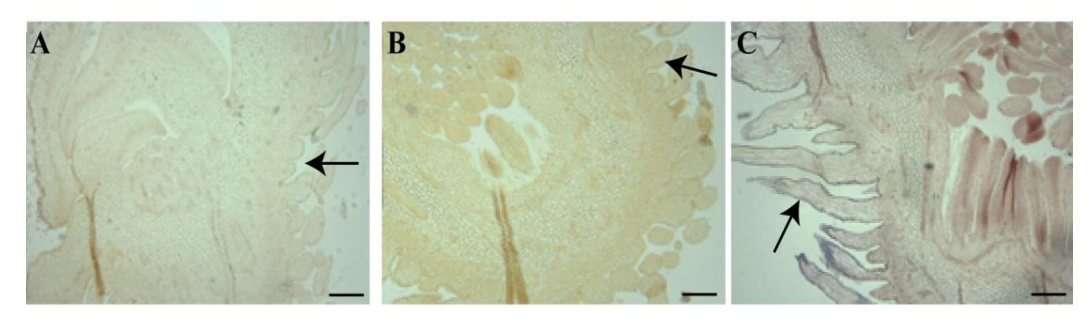
表 2 刺梨果实（花后 3、5 和 7 周后）的三个不同部位果刺数量和长度的比较
Table 2 Number and length of prickles on various type of *Rose roxburghii* fruits at 3, 5 and 7 WAF (weeks after flowering)

不同发育期的果实 Fruits at different development stage	果刺的数量 Number of prickles			果刺的长度 Length of prickles		
	上部 Upper	中部 Middle	下部 Lower	上部 Upper	中部 Middle	下部 Lower
花后 3 周 (3 WAF)	29.3±1.5 b	65.4±3.5 a	32.6±6.5 a	1.33±0.31 a	2.50±0.54 a	1.72±0.73 a
花后 5 周 (5 WAF)	28.0±3.6 a	67.3±2.1 b	34.3±3.1 b	1.83±0.29 b	3.16±0.76 b	2.62±0.64 b
花后 7 周 (7 WAF)	29.7±1.2 b	70.6±8.3 c	32.7±6.5 a	2.38±0.75 c	4.33±0.29 c	3.28±1.17 c

注：表中的字母表示数据显著性差异。
Note: The letters indicated statistical significance of differences.

刺梨经过一定时间的营养生长后，在外界各因素达到一定要求时进入生殖生长阶段，这是刺梨果实形成的必经阶段。当刺梨进入生殖生长时期，刺梨茎端分生组织细胞开始分裂分化，在花的发育过程中刺梨萼片上的刺细胞也开始不断发生。花的发育是一个动态的过程，最初观察到花萼上有少量已经形成的刺结构，随着花的发育，萼片上刺结构会成批次的产生，逐渐增多（图 2：A）。当花的结构慢慢向外展开时，在花瓣原基基部处，雄蕊原基开始慢慢发育形成一些粗而短的近似椭圆形的结构，刺原基突起内的基本分生组织细胞进行切向分裂，细胞数目开始增加，表皮上的细胞也进行分裂以适应刺的向外延伸（图 2：B）。

基部内的细胞迅速分裂使基部扩展变大，中部细胞增多，形态也发生变化，椭圆形的细胞开始变细、变长，尖端呈“针”状型结构，刺结构的整体外形初步形成（图 2： C）。



注：A、B、C 是不同花芽分化时期果刺的形成过程，箭头所指为果刺，Bar=1 mm

Note: A, B, C indicated various prickles development at early stage of flower bud. The arrow represented prickles bar=1 mm

图 2 刺梨早期果刺细胞学观察

Fig.2 Cytological observation of fruit prickles at different development stages of *Rosa roxburghii*

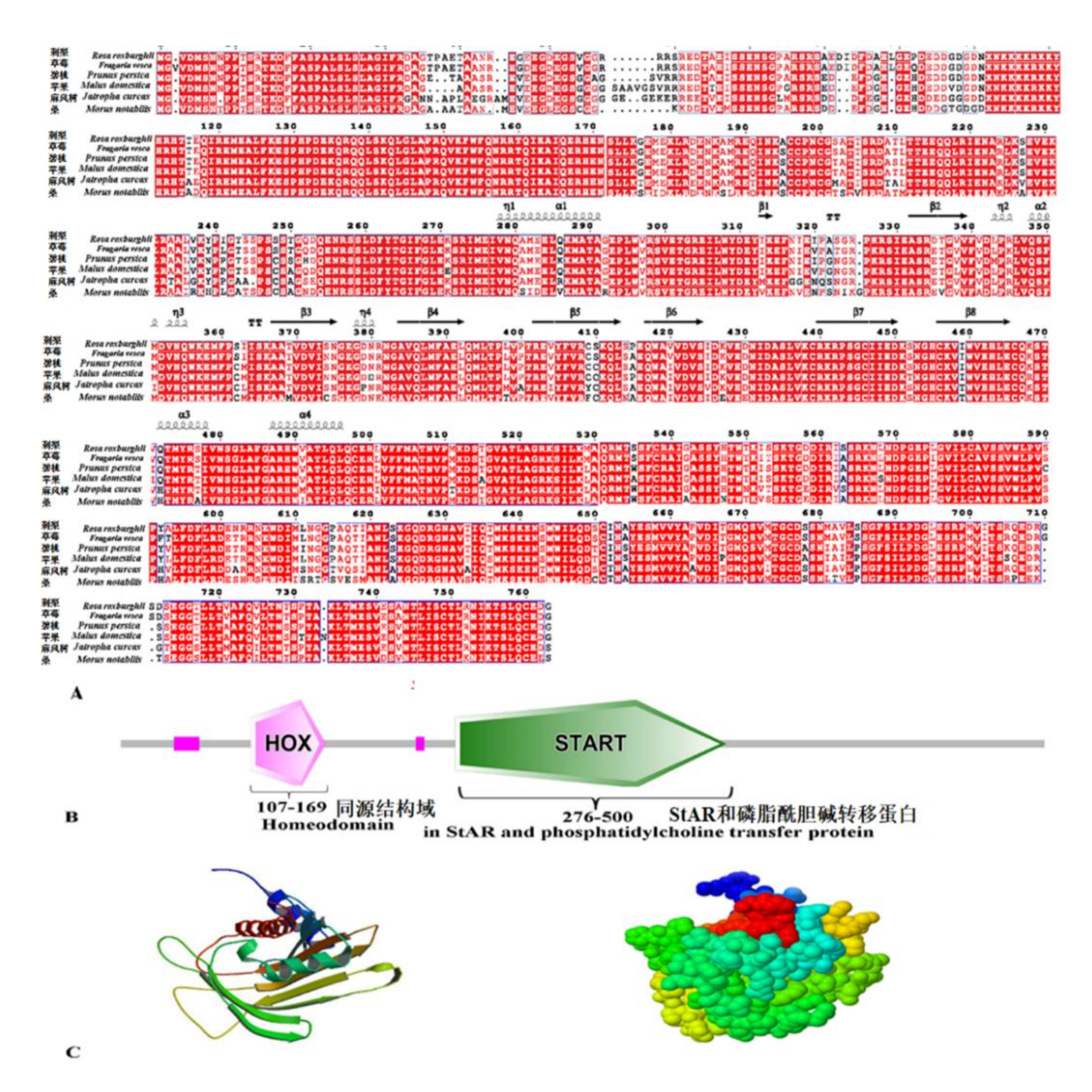
2.2 刺梨 RrGL2 的序列分析

以‘贵农 5 号’的 RNA 为模板，通过 RACE 方法得到 *RrGL2* 的全长 cDNA。*RrGL2*（Genebank 登录号：MG386498）的全长为 2292 bp，编码 763 个氨基酸。BLAST 分析表明，刺梨的 *RrGL2* 序列和草莓（*Fragaria vesca subsp*. Vesica）、碧桃（*Prunus persica*）、苹果（*Malus domestica*）、麻风树（*Jatropha curcas*）和桑（*Morus notabilis*）GL2 具有较高的同源性，分别是 96％、88％、86％、78％和 80％的相似性。

ProtParam 分析 RrGL2 得到其分子量为 8.49 kDa。RrGL2 的等电点是 5.73。 RrGL2 含有 13.76％的酸性氨基酸，13.63％的碱性氨基酸，38.79％的疏水性氨基酸，27.39％的带电荷氨基酸和 61.07％的极性氨基酸。ProtScale 分析 RrGL2 得到其亲水性氨基酸的数量明显大于疏水性氨基酸的数量，且亲水性的平均值为-0.525，表明 *RrGL2* 编码的蛋白质为可溶性蛋白质。TMHMM2.0 预测表明 RrGL2 不含有跨膜结构域。

2.3 RrGL2 的同源蛋白和系谱树分析

将不同物种的 GL2 进行比对分析（图 3：A）。BLAST 分析表明，RrGL2 和草莓（*Fragaria vesca* subsp.）、碧桃（*Prunus persica*）、苹果（*Malus domestica*）、麻风树（*Jatropha curcas*）和桑（*Morus notabilis*）的蛋白质序列相似性较高，分别是 98%、92%，90%、83%和 82%相似性。



注：**A**. RrGL2 与其他物种的序列比对图；**B**. 二级结构域 HOX (107-169 aa)和 START (276-500 aa)；**C**. RrGL2 的三维结构域(PDB: 2Z9Z)。

Note: **A**. Amino acid sequence alignments of RrGL2 with other five plants; **B**. The second motifs HOX (107-169 aa) and START (276-500 aa); **C**. The third dimensional protein structure of RrGL2 (PDB number: 2Z9Z)

图 3 RrGL2 的结构

Fig.3 Structure of RrGL2

基于 RrGL2 的三维结构（PDB 编号：2Z9Z），利用 ESPript 3.0 得到蛋白质的二级结构和三级结构。如图 3：A 所示，β-转角是序列的主要二级结构。多序列比对的结果表明，RrGL2 与其他物种的二级结构域也较为保守。SMART 分析显示 RrGL2 的结构域包括两个主要结构域，分别是位于 107~169 氨基酸的同源结构域 HOX（homeobox）和位于 276-500 氨基酸的 START（STAR 和磷酰胆碱转移蛋白）（图 3：B）。图 3：C 以两种不同的方式显示了 RrGL2 三维结构，在不同的折叠处，包括转角和不规则的卷曲均可发生与 DNA/RNA 的结合。使用 Mega 6.0 软件，得到刺梨与其他植物的亲缘关系，如图 3 所示。图中显示 RrGL2 与草莓中的 GL2 序列最相似。除此之外，RrGL2 与其他蔷薇科植物的亲缘关系也较近，如桃，樱桃，梅和苹果。

利用 Mega 6.0 软件构建 RrGL2 的系统进化树图，如图 4 所示，RrGL2 与草莓中的 GL2 序列最相似，其他蔷薇科植物的亲缘关系也较近，如桃，樱桃，梅和苹果。

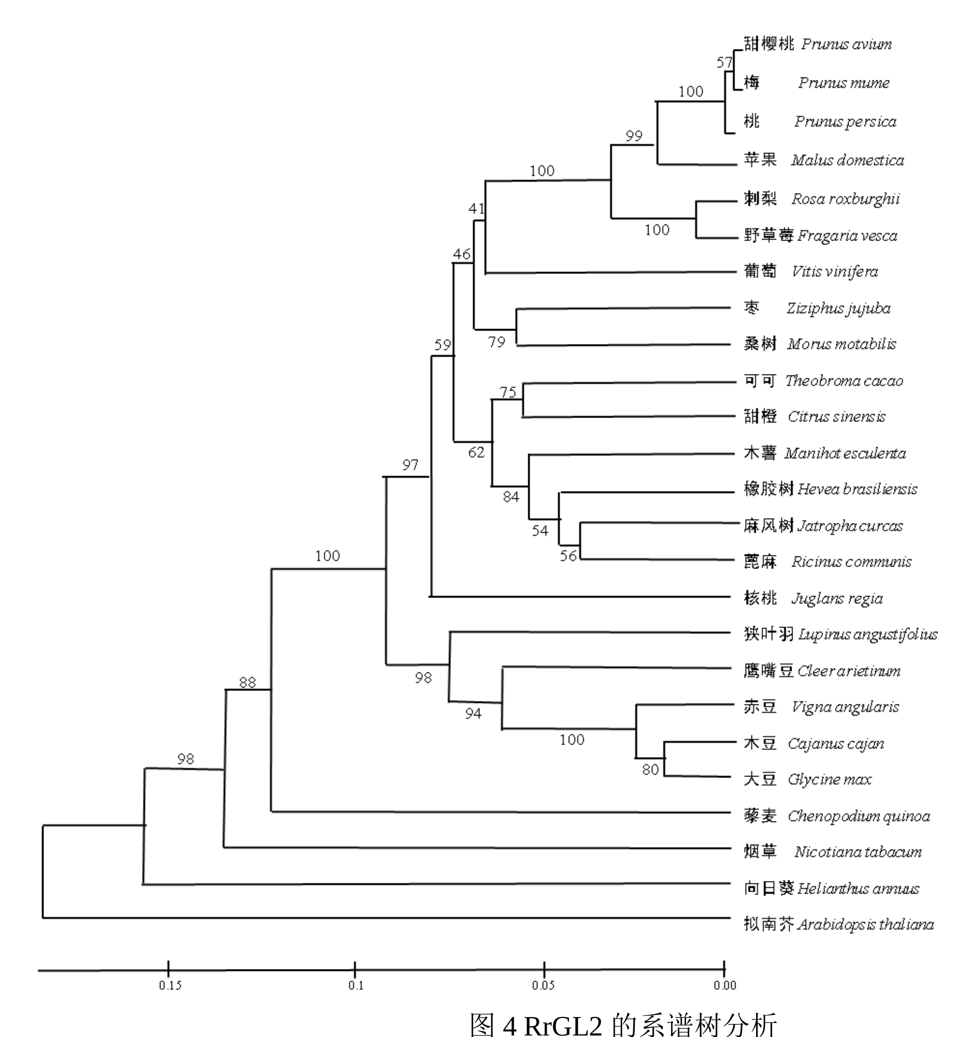


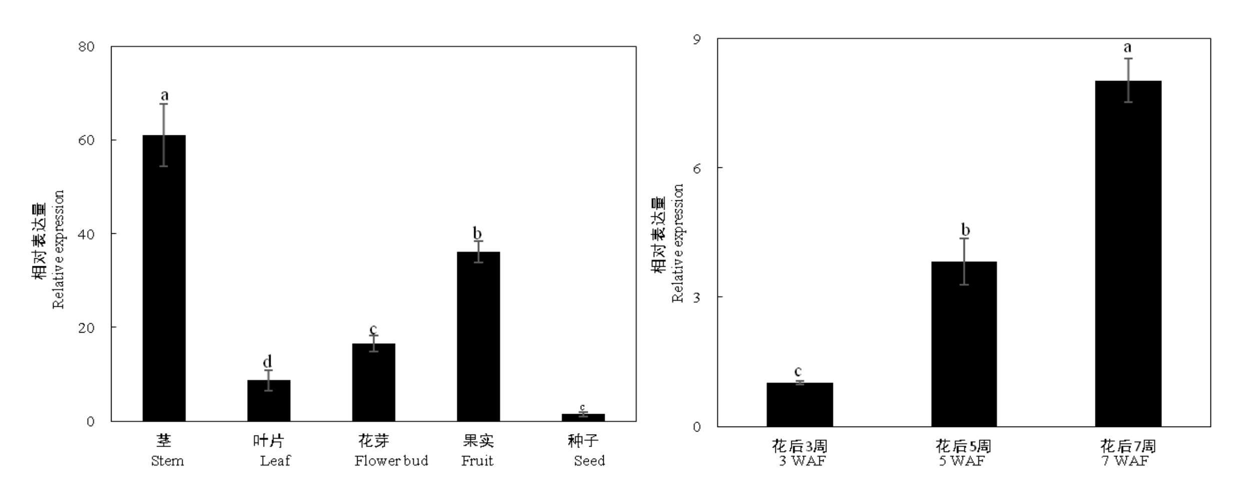
图 4 RrGL2 的系谱树分析

Fig.4 Phylogenetic tree of RrGL2 to the GL2 of other species

2.4 RrGL2 在不同组织和果实发育的表达模式

利用 Real-time PCR 获得 *RrGL2* 在不同组织中的表达水平，结果如图 5：A 和图 5：B 所示。*RrGL2* 在种子中的表达量最低，茎和果实的 *RrGL2* 表达量分别是种子的 59.95 倍和 33.52 倍。叶和花中 *RrGL2* 的表达量分别是种子中的 7.99 倍和 15.62 倍。

从图 5：B 中得到花后 3、5 和 7 周的果刺中 *RrGL2* 表达量。结果表明随着果实的发育和果刺的增加，*RrGL2* 表达量逐渐增加，在花后 7 周果刺中 *RrGL2* 表达量最高，分别是花后 3 周和 5 周果刺中的 7.87 倍和 2.10 倍，可以推断 *RrGL2* 在果刺的形成中发挥一定的作用。



注：**A**. 茎、叶片、花芽、果实和种子中的表达；**B**. 花后 3 周（3 WAF）、5 周（5 WAF）和 7 周（7 WAF）果刺中的表达。字母代表数据的显著性差异。

Note: **A**. Expression pattern of stem, leaf, flower, fruit and seed; **B**. Expression pattern at 3, 5 and 7 WAF (weeks after flowering). The letter indicated statistical significance of differences.

图 5 *RrGL2* 在不同组织和果实发育期中的表达水平

Fig.5Expression pattern of *RrGL2* in different tissues and development

3 讨论

形态观察结果发现刺梨茎上有一些坚硬的刺，果实外表面上密披果刺。通过细胞学观察得到，果刺在花芽阶段已经形成。同时，*RrGL2* 在茎和果中的表达水平高于其他组织，说明 *RrGL2* 可能在果刺和表皮毛形态发生中发挥重要作用。本文研究表明 *RrGL2* 作用在果实发育的早期的果刺中检测到 *RrGL2* 的表达，证明它可能在果实发芽阶段起作用(Vernoud et al., 2009; Ohashi et al., 2002)。随着果实的成熟，果刺的数量和长度都增加。与形态学改变相对应，*RrGL2* 的表达水平也随之提高。这些结果暗示 *RrGL2* 可能与刺梨果刺发育起始密切相关(Rerie et al., 1994)。而在花后 7 周的果实果刺中 *RrGL2* 表达量达到最高，暗示与刺发育相关的 *RrGL2* 基因能够增加果刺的形成。转录因子 *EGL3* 和 *TTG1* 参与 *GL2* 的表达调控，最终导致表皮毛形成(Song et al., 2015)。MYB 类蛋白如 GL1 和 WER，可通过与 bHLH 蛋白相互作用来调节 *GL2* 同源框基因在特定部位的表达。同时 *GL2* 的表达还受到 CAPRICE MYB 的抑制(Lee & Schiefelbein, 1999)。*RrGL2* 作为一个关键基因和其它参与调节刺梨果刺发育的基因功能还需要进一步的功能分析确定。

本文通过 RACE 技术从刺梨中克隆得到 *RrGL2*。在 NCBI blast 数据库中搜索获得 RrGL2 与其他物种的氨基酸结构域的高度相似性的 GL2 类蛋白成员，表明 RrGL2 可能与这些物种中的 GL2 具有类似的功能，参与调节果刺的起始，形态发生和发育(Wang et al., 1999)。结构域分析显示 RrGL2 是一个 Homeodomain 蛋白。Homeodomain 蛋白可结合 DNA 并调节转录 DNA 模板，参与形成多蛋白复合物从而调控发育基因的表达(Foronda et al., 2009)。RrGL2 的三级结构是 DNA/RNA 结合螺旋结构和 orthogonal 结构，这也暗示 RrGL2 可以与 DNA 相互作用并控制。同时，GL1 和 GL3 转录因子的相互作用激活 GL2 的表达(Wang & Chen, 2008)。据报道 GL2 以细胞位置依赖性方式在根毛分化形成过程中调节根毛发育，并影响种子含油量(Shen et al., 2006; Masucci et al., 1996)。

本研究通用生物信息学的分析方法得到 RrGL2 调节蛋白与其他物种中的直系同源物，展现 GL2 中正向进化选择的潜力。利用时空表达的检测获得 *RrGL2* 在不同组织和果刺不同发育阶段的相对表达水平。因此，

本文为揭示和理解参与刺梨果刺发育的基因以及果刺发育分子机制提供了分子基础，为通过基因工程培育更少或甚至无刺刺梨提高理论基础。

参考文献：

AN L, ZHOU Z, YAN A, et al., 2011. Progress on trichome development regulated by phytohormone signaling [J]. Plant Signal Behav, 6(12): 1959-1962.

DI CM, AL E, 1996.The Arabidopsis Athb-10 (GLABRA2) is an HD-Zip protein required for regulation of root hair development [J]. Plant J Cell Mol Biol, 10(3): 393-402.

FENG LG, LUAN XF, WANG J, et al., 2015. Cloning and expression analysis of transcription factor *Rrttg1* related to prickle development in rose (*Rosa Rugosa*) [J]. Arch Biol Sci, 67(4): 1219-225.

FORONDA D, NAVAS LF, GARAULET DL, et al., 2009. Function and specificity of Hox genes [J]. Int J Dev Biol, 53(8-10): 1404-1419.

FYVIE MJ, MURRAY JA, KILBY NJ, 2015. Mosaic analysis of *GL2* gene expression and cell layer autonomy during the specification of *Arabidopsis* leaf trichomes [J]. Genesis, 28(2): 68-74.

GAN L, XIA K, CHEN JG, et al., 2011. Functional characterization of trichomeless2, a new single-repeat R3 MYB transcription factor in the regulation of trichome patterning in Arabidopsis [J]. Bmc Plant Biol, 11(1): 176-187.

GAO Y, GONG X, CAO W, et al., 2008. SAD2 in Arabidopsis functions in trichome initiation through mediating GL3 function and regulating GL1, TTG1 and GL2 expression [J]. J Integr Plant Biol, 50(7): 906-917.

GOMES S, BACELAR E, MARTINSLOPES P, et al., 2012. Infection process of olive fruits by *Colletotrichum acutatum* and the protective role of the cuticle and epidermis [J]. J Agric Sci, 4(2): 101-110.

KELLOGG AA, BRANAMAN TJ, JONES NM, et al., 2011. Morphological studies of developing rubus prickles suggest that they are modified glandular trichomes [J]. Botany, 89(4): 217-226.

LEE MM, SCHIEFELBEIN J, 1999. Werewolf, a MYB-related protein in Arabidopsis, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning [J]. Cell, 99(5): 473-477.

LIU W, LI S Y, HUANG XE, et al., 2012. Inhibition of tumor growth in vitro by a combination of extracts from *Rosa roxburghii* Tratt and *Fagopyrum cymosum* [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 13(5): 2409-2414.

MASUCCI JD, RERIE WG, FOREMAN DR, et al., 1996. The homeobox gene *glabra2* is required for position-dependent cell differentiation in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana* [J]. Development, 122(4):1253-1260.

OHASHI Y, OKA A, RUBERTI I, et al., 2002. Entopically additive expression of glabra2 alters the frequency and spacing of trichome initiation [J]. Plant J, 29(3): 359-369.

PESCH M, HÜLSKAMP M, 2011. Role of triptychon in trichome patterning in *Arabidopsis*[J]. Bmc Plant Biol, 11(1): 130-138.

PESCH M, SCHULTHEIßI, KLOPFFLEISCH K, et al., 2015. Transparent testa glabra1 and glabra1 compete for binding to glabra3 in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 168 (2): 584-597.

PU L, SUO J, XUE Y, 2003. Molecular control of plant trichome development [J]. Acta Genet Sin, 30 (11): 1078-1084.

RAMSAY NA, GLOVER BJ, 2005. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity [J]. Trends Plant Sci, 10(2): 63-70.

RERIE WG, FELDMANN KA, MARKS MD, 1994. The glabra2 gene encodes a homeo domain protein required for normal trichome development in *Arabidopsis* [J]. Gene Dev, 8 (12): 1388-1399.

SHEN B, SINKEVICIUS KW, SELINGER DA, et al., 2006. The homeobox gene glabra2 affects seed oil content in *Arabidopsis* [J].

Plant Mol Biol, 60(3): 377-387.

SHI L, KATAVIC V, YU Y, et al., 2012. Arabidopsis glabra2 mutant seeds deficient in mucilage biosynthesis produce more oil [J]. Plant J Cell Mol Biol, 69(1): 37-46.

SONG SK, KWAK SH, CHANG SC, et al., 2015. Werewolf and enhancer of glabra3 are interdependent regulators of the spatial expression pattern of glabra2 in *Arabidopsis* [J]. Biochem Biophys Res Comm, 467(1): 94-100.

SZYMANSKI DB, JILK RA, POLLOCK SM, et al., 1998. Control of *GL2* expression in Arabidopsis leaves and trichomes [J]. Develop, 125(7): 1161-1171.

VAN FH, VAN CS, RAUTENBACH GS, et al., 2008. *In vitro* antioxidant, antimutagenic and genoprotective activity of *Rosa roxburghii* fruit extract [J]. Phyto Res, 22(3): 376-383.

VERNOUD V, LAIGLE G, ROZIER F, et al., 2009. The HD-ZIP IV transcription factor OCL4 is necessary for trichome patterning and anther development in maize[J]. Plant J, 59(6): 883-894.

WANG S, CHEN JG, 2008. Arabidopsis transient expression analysis reveals that activation of glabra2 may require concurrent binding of glabra1 and glabra3 to the promoter of glabra2 [J]. Plant Cell Physiol, 49(12): 1792-1804.

WANG YL, NIE JT, CHEN HM, et al., 2016. Identification and mapping of Tril, a homeodomain-leucine zipper gene involved in multicellular trichome initiation in *Cucumis sativus* [J].Theor Appl Genetics, 129(2): 305-316.

XU P, ZHANG WB, CAI XH, et al., 2014. Flavonoids of *Rosa roxburghii* Tratt act as radioprotectors [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 15(23): 8171-175.

ZHAO M, MOROHASHI K, HATLESTAD G, et al., 2008. The TTG1-bHLH-MYB complex controls trichome cell fate and patterning through direct targeting of regulatory loci [J]. Development, 135(11): 1991-1999.